

METHODS FOR INCREASING HEMATOPOIETIC CELLS

Publication number: JP10510842 (T)

Publication date: 1998-10-20

Inventor(s):

Applicant(s):

Classification:

- international: A61K38/00; A61K35/14; A61K35/28; A61K38/19; A61P7/00; A61P43/00; A61K38/00; A61K35/14; A61K35/28; A61K38/19; A61P7/00; A61P43/00; (IPC1-7): A61K35/28; A61K35/14; A61K38/00

- European: A61K35/28; A61K38/19

Application number: JP19960500797T 19960529

Priority number(s): WO1996US07880 19960529; US19950482212 19950607

Also published as:

JP3058353 (B2)

WO9640218 (A1)

US6013067 (A)

MX9709244 (A)

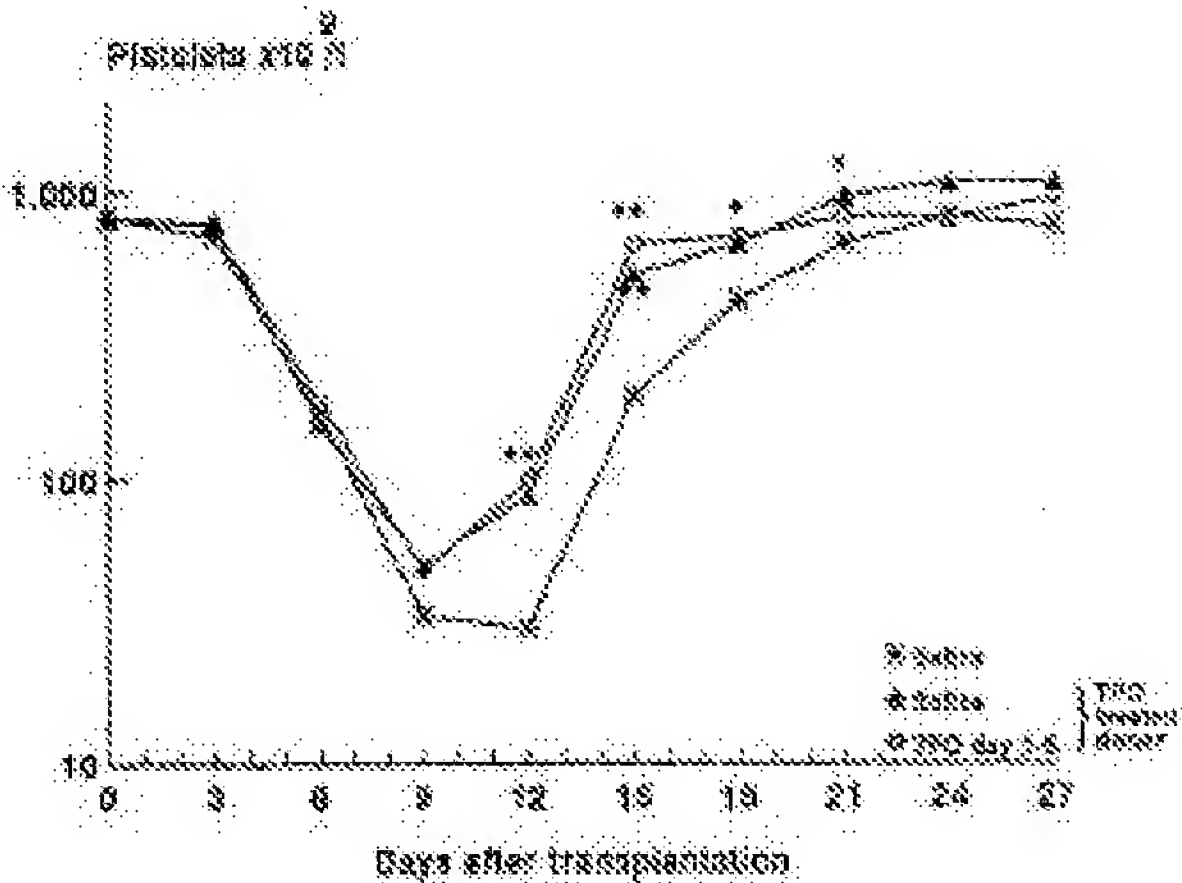
EP0831888 (A1)

more >>

Abstract not available for JP 10510842 (T)

Abstract of corresponding document: **WO 9640218 (A1)**

Methods for increasing hematopoietic cells, including platelets and erythrocytes, in patients receiving bone marrow or peripheral blood stem cell transplants are disclosed. The methods comprise administering to a donor an amount of thrombopoietin sufficient to stimulate proliferation of cells of the myeloid lineage, collecting cells from the donor, and administering the collected cells to a recipient patient. The recipient patient may be treated with additional thrombopoietin. The methods are useful within allogeneic and autologous transplantation procedures.

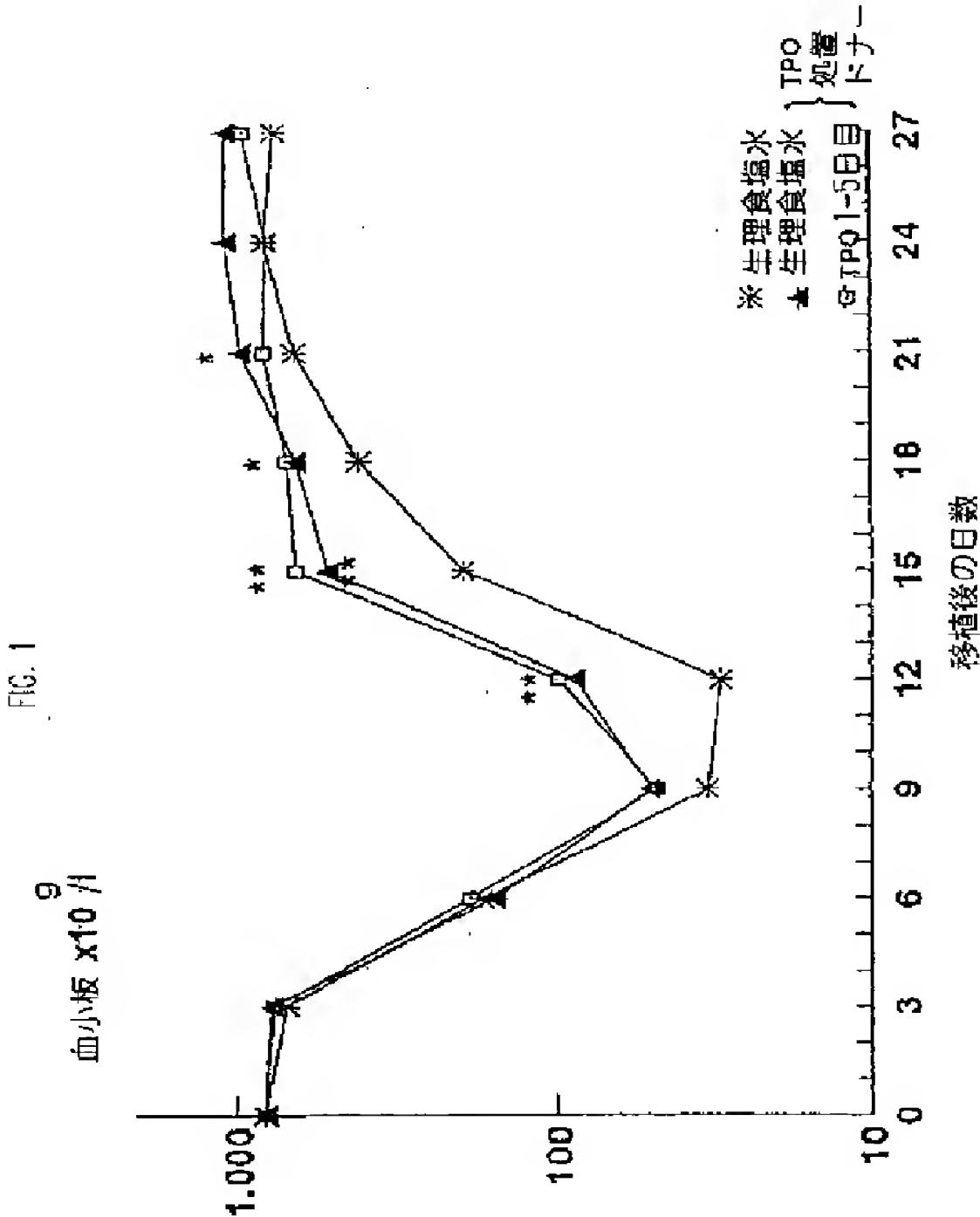


Data supplied from the **esp@cenet** database — Worldwide

(51)Int.Cl. ⁶		識別記号	F I	
A 6 1 K	35/28		A 6 1 K	35/28
	35/14			35/14
	38/00	A B Y		37/02
		A E D		
				Z
				A B Y
				A E D
審査請求 有 予備審査請求 有 (全 29 頁)				
(21)出願番号 特願平9-500797			(71)出願人 ザイモジェネティクス, インコーポレイテ	
(86) (22)出願日 平成8年(1996)5月29日			ィド	
(85)翻訳文提出日 平成9年(1997)12月5日			アメリカ合衆国, ワシントン 98102, シ	
(86)国際出願番号 P C T / U S 9 6 / 0 7 8 8 0			アトル, イーストレイク アベニュー イー	
(87)国際公開番号 W O 9 6 / 4 0 2 1 8			スト 1201	
(87)国際公開日 平成8年(1996)12月19日			(72)発明者 フィベ, ビレム エー.	
(31)優先権主張番号 0 8 / 4 8 2 , 2 1 2			オランダ国, エヌエル-2161 エーペー	
(32)優先日 1995年6月7日			リズ, ベルドールストストラート 9	
(33)優先権主張国 米国 (U S)			(72)発明者 グロスマン, アンジェリカ	
			アメリカ合衆国, ワシントン 98115, シ	
			アトル, ノース イースト シックスティ	
			ース 2809	
			(74)代理人 弁理士 石田 敬 (外3名)	
			最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 造血細胞の増加方法

(57)【要約】
骨髓又は末梢血液幹細胞移植を受けた患者において、血小板及び赤血球を含む造血細胞を増加させるための方法を開示する。本法は、骨髓性系統の細胞の増殖を刺激するために十分な量のトロンボポイエチンをドナーに投与し、そのドナーから細胞を採取し、そして採取された細胞を受容体に投与することを含む。受容体患者は、追加のトロンボポイエチンで処置されることができる。本法は、同種及び自己移植手順において有用である。



【特許請求の範囲】

1. 造血細胞の増加を必要とする受容体患者において造血細胞を増加させる方法であって：

ドナーにおける骨髓性系統の細胞の増殖を刺激するために十分なトロンボポイエチン(TPO)の量を、そのドナーに投与し；

上記ドナーから、骨髓細胞又は末梢血液幹細胞である細胞を採集し；そして
上記骨髓細胞又は末梢血液幹細胞を、受容体患者に投与する、
ことを含む方法。

2. 前記受容体患者が化学療法又は放射線療法により処置される、請求項1に記載の方法。

3. 前記ドナー及び受容体患者が、同一の個体である、請求項1に記載の方法。

4. 前記受容体患者が、前記採取段階と第2の投与段階との間に化学療法又は放射線により処置される、請求項3に記載の方法。

5. 前記細胞が、骨髓細胞である、請求項1に記載の方法。

6. 前記細胞が、末梢血液幹細胞である、請求項1に記載の方法。

7. 前記骨髓細胞又は末梢血液幹細胞を投与した後に又はそれと同時に、前記受容体に、血小板回復又は赤血球回復を強化するために十分な量のトロンボポイエチンを投与することをさらに含む、請求項1に記載の方法。

8. 前記 TPOがヒト TPOである、請求項1に記載の方法。

9. 移植のための細胞を調製する方法であって：

ドナーに、そのドナーにおける骨髓性系統の細胞の増殖を刺激するために十分な量のトロンボポイエチン(TPO)を投与し；そして

上記ドナーから、骨髓細胞又は末梢血液幹細胞である細胞を、採集する、
ことを含む方法。

10. 前記 TPOがヒト TPOである、請求項9に記載の方法。

11. 前記細胞が骨髓細胞である、請求項9に記載の方法。

12. 前記細胞が末梢血液幹細胞である、請求項9に記載の方法。

13. 化学療法又は放射線療法を受けた患者において血小板又は赤血球回復を刺激する方法であって：

上記患者に、上記患者における骨髓性系統の細胞の増殖を刺激するために十分な量の TPOを、投与し；

化学療法又は放射線療法前に上記患者から骨髓細胞又は末梢血液幹細胞を採取し；そして

化学療法又は放射線療法の後に、上記の採取した細胞を、上記患者に戻す、ことを含む方法。

14. 前記の採取した細胞を戻した後又はそれと同時に、上記患者に、血小板回復又は赤血球回復を強化するために十分な量のトロンボポイエチンを投与することをさらに含む、請求項13に記載の方法。

15. 前記 TPOがヒト TPOである、請求項13に記載の方法。

16. 前記細胞が骨髓細胞である、請求項13に記載の方法。

17. 前記細胞が末梢血液幹細胞である、請求項13に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

造血細胞の増加方法

本発明の背景

造血 (Hematopoiesis) は、血液細胞が、その骨髓内の多能性幹細胞から発達し、そして分化するプロセスである。このプロセスは、それらの標的細胞上の膜結合レセプターを介して作用するポリペプチド成長因子（サイトカイン）の複雑な相互作用を含む。サイトカイン作用は、細胞の増殖と分化をもたらし、特定のサイトカインに対する応答は、しばしば、系統－特異的及び／又は段階－特異的である。幹細胞から単一細胞型、例えば、血小板への発達は、適切な順序における2以上のサイトカインの協調作用を必要とすることができる。長年にわたり血小板の生産は、特定の体液因子により調節されることができると推定されていた。初期の実験は、血小板減少症の動物の血漿又は尿が、巨核球のコロニー形成を促進し、そして骨髓巨核球のサイズを増加させる活性を含むことを示した。この活性は、その文献中、“トロンボポイエチン (thrombopoietin)” と言われている（最近、McDonald, Exp. Hematol. 16:210-205, 1988及びMcDonald, Am. J. Ped. Hematol. Oncol. 14 : 8-21, 1992 によりレビューされた）。この活性の低濃度及び好適なバイオアッセイの欠如は、このタンパク質の精製及び特徴付けを長い間妨害した。トロンボポイエチンは、現在、遺伝子操作された培養細胞を使用して製造されている。de Sauvage et al., Nature 369:533-538, 1994 ; Lok et al., Nature 369:565-568, 1994 ; Kaushansky et al., Nature 369:568-571, 1994 ; 及びBartley et al., Cell 77:1117-1124, 1994 を参照のこと。

トロンボポイエチンは、正常動物 (Lok et al., *ibid.*) 及び血小板減少症の動物 (Sprugel et al., Blood 84(10 Suppl. 1):242a, 1994) において血小板数を増加させること、そして赤血球の生産を刺激すること (Kaushansky et al., J. Clin. Invest., 出版中) が示されている。インビトロにおいては、巨核球になる運命のCD34⁺細胞の生存及び増殖を強化する (Papayannopoulou et al., Blood 84(10 Suppl. 1):324a, 1994)。

TPDのクローニング及び特徴付けは、造血の刺激におけるその臨床的使用の検

査を現在可能にしているけれども、血小板減少症と貧血症は、例えば、癌患者の化学療法及び放射線療法に関して、かなりの臨床的な問題として残る。自己移植を含む、骨髄移植及び末梢血液幹細胞移植を受容した患者において血小板生産を刺激する方法のための特定の必要性が未だ存在する。赤血球生産を刺激するための必要性も未だ存在する。本発明は、これらの必要性に取り組み治療方法を提供し、そして他の関連する利点を提供する。

本発明の要約

本発明は、上記のような増加の必要な受容患者において造血細胞を増加させるための方法を提供する。これらの方法は、(a) ドナーにおける骨髄性系統の細胞の増殖を刺激するために十分なトロンボポイエチン(TPO)の量をドナーに投与し；(b) そのドナーから、骨髄細胞又は末梢血液幹細胞である細胞を集め；そして(c) 受容患者にその骨髄細胞又は末梢血液幹細胞を投与する、段階を含む。このドナー及び受容体は、異なる個体又は同一の個体であることができる。本発明の1の態様においては、その受容体患者は、化学療法又は放射線療法により治療されてきた。他の態様においては、骨髄細胞又は末梢血液幹細胞の投与の後又はそれと同時に、血小板

の回復又は血小板の回復を強化するために十分な TPOの量が、その受容体患者に投与される。

他の態様においては、本発明は、ドナーにおける骨髄性系統の細胞の増殖を刺激するために十分な量の TPOをドナーに投与し、そしてそのドナーから骨髄細胞又は末梢血液幹細胞である細胞を集めることを含む移植のための細胞の調製方法を提供する。

第3の態様においては、本発明は、化学療法又は放射線療法を受けている患者における血小板回復又は赤血球回復を刺激する方法であって、(a) その患者における骨髄性系統の細胞の増殖を刺激するために十分な量の TPOをその患者に投与し；(b) 化学療法又は放射線療法前にその患者から骨髄細胞又は末梢血液幹細胞を集め；そして(c) 化学療法又は放射線療法の後にその患者に上記の集めた細胞を戻す、を含む方法を提供する。1の態様においては、本法は、上記の集

められた細胞を戻した後に又はそれと同時に、血小板の回復又は赤血球の回復を強化するために十分な量の TP0を上記患者に投与することをさらに含む。

本発明の上記及び他の態様は、以下の詳細な説明及び添付図面を参照してより明らかになるであろう。

図面の簡単な説明

図1は、受容動物の血小板数に対する、TP0-又は媒体-処置ドナー・マウスからの骨髓細胞の移植の効果を示す。1の実験においては、TP0-処置骨髓の受容体も、TP0(20kU/日i.p.)で処置された。データを、2実験における10~20匹のマウスの平均として表す。*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ 。

図2は、受容体動物における赤血球数に対する、TP0-又は媒体-処置ドナー・マウスからの骨髓細胞の移植の効果を示す。データ

は、2実験における20匹のマウスの平均として表す。*, $p < 0.05$; **, $p < 0.05$ 。

図3は、移植後 TP0処置による又はよらない、TP0-又は媒体-処置ドナーからの骨髓移植を受けたマウスにおける血小板回復を示す。

本発明の詳細な説明

用語“幹細胞”を、本明細書中、多能性造血幹細胞及び骨髓性原細胞(myeloid progenitor cell)を表すために使用する。

用語“移植”を、本明細書中、ドナーから細胞を取り出し、そしてその後受容体にその細胞を投与するプロセスを表すために使用する。この用語は、そのドナーと受容体が同一種の異なる個体である同種移植(allogeneic transplantation); 及びそのドナーと受容体が同一個体である自己移植(autologous transplantation)を包含する。

用語“造血細胞の増加”は、疾患又は治療的介入から生じた除去(ablation)の如きそれらの除去後の、造血細胞レベルの回復(restoration)又は強化された回復(enhanced recovery)を表すために、本明細書中に使用する。

用語“トロンボポイエチン”は、同一種からの MPLレセプターに特異的に結合し、そしてインビボにおける血小板生産を刺激するそれらの能力を特徴とするタ

ンパク質を包含する。正常なテスト動物においては、TP0は、毎日の投与の開始後10日以内に100%以上、血小板レベルを増加させることができる。代表的なヒトTP0 cDNA配列を、配列番号：1に示し、そして対応のアミノ酸配列を、配列番号：2に示す。分析的及び実験的証拠は、上記成熟タンパク質が、残基Ser-22に始まることを示している。当業者は、例示した配列が

、ヒトTP0遺伝子の単一の対立遺伝子に対応し、そして対立遺伝子の変化が存在すると予想されることを認めるであろう。対立遺伝子変異体は、サイレントな突然変異を含むもの、並びに突然変異がアミノ酸配列の変化をもたらすものを含む。当業者が、例えば、代替コドンを使用したヌクレオチド配列の操作を容易にするであろう部位を遺伝子操作することにより、アミノ酸配列における保存的变化を作り出すコドンの置換等により、追加の変異体を作成することができるであろうことも明らかであろう。対立遺伝子及び遺伝子操作された変異体TP0sの使用が、本発明により企図される。さらに、長さ約150以上のアミノ酸のアミノ末端TP0ポリペプチドは、活性であることが知られており（de Sauvage et al., *ibid.* ; Bartley et al., *ibid.* ; 同時係属中の共同で譲渡された米国特許出願逐次番号第08/346,999号）、そしてTP0のこのような切断された形態の使用は、本発明の範囲内にある。非ヒト種からのトロンボポイエチンは、文献中に開示されている（Lok et al., *ibid.* ; de Sauvage et al., *ibid.* ; Bartley et al., *ibid.*）。

本発明は、患者、特に、例えば、癌の治療における、放射線療法及び／又は化学療法を経験する患者において、造血細胞を増加させるための方法を提供する。このような療法は、骨髓中の分裂性原細胞及び末梢血液を殺し、療法を制限し、そしてしばしば、血小板及び他の血液細胞の循環レベルを回復するために輸注を必要とする。特に関心があるのは、放射線療法後に骨髓及び／又は末梢血液幹細胞移植を受容する患者並びに骨髓移植を必要とする先天的な代謝欠陥を患う患者である。これらによって示されるものの中には、肺癌、白血病、リンパ腫、多発性骨髓腫及び先天的欠陥、例えば、重度併合免疫不全、サラセミア、並びに鎌状赤血球貧血の治療に関連する骨髓移植がある。末梢血液幹細胞移植は、その血液

中の腫瘍細胞

の危険が存在しない症状において好ましい。

骨髓及び末梢血液幹細胞移植を実施するための方法は、本分野において知られている。レビューのためには、Snyder et al., "Transfusion Medicine" in Benz and McArthur, eds., Hematology 1994, American Society of Hematology, 96-106, 1994 を参照のこと。末梢血液幹細胞は、許容された臨床手順に従って白血球搬出法 (leuka pheresis) により集められる。造血原細胞は、細胞表面マーカー (例えば、CD34) に基づき選択されることができ、所望の細胞の濃縮及び汚染性腫瘍細胞の消失を許容する。集められた細胞は、必要とされるまで好適な低温保存剤 (例えば、ジメチル・スルホキシド、ヒドロキシエチル・スターチ) 中で冷凍保存される。骨髓細胞は、麻酔下で骨穿刺によりドナーから集められる。この容量を減少させるために、集められた骨髓は、通常、その細胞成分から血漿を分離するために処理される。血漿の除去は、同種移植における赤血球不適合を取り除くこともできる。この細胞画分は、密度勾配技術又は自動分離法を使用して単核細胞について濃縮され、そしてさまざまな細胞毒性剤を使用してT細胞を減少されることができ。集められた骨髓細胞は、制御された速度での冷凍及び低温保護剤の使用を含む確立された手順に従って、低温保存される。幹細胞は、解凍に関連する損失を最小化するために、使用直前に温水浴内で解凍される。同種移植の場合においては、ドナーと受容体は、移植対宿主疾患の危険を最小化するために、組織適合される。

造血細胞における増加は、幹細胞、特に、CD34⁺幹細胞を含む骨髓性系統の細胞、並びにCD34⁺幹細胞由来の細胞の受容体患者内への移植から生じる。特に重要なのは、それぞれ、その受容体の血小板と赤血球集団を再構成する、巨核球と赤血球系統における細胞である。

本発明においては、ドナーは、骨髓又は末梢血液細胞の供与前に、骨髓性系統の細胞の増殖を刺激するために十分な量で、TPOで処置される。この量は、一般に、0.51 g/kg/日～401 g/kg/日、好ましくは、11 g/kg/日～201 g

／kg／日の範囲内にあるであろう。ドナーの処置は、1～数日間、好ましくは、約2～5日間の期間にわたり、骨髓又は末梢血液幹細胞の収穫前3日間～2週間の期間の間、実施されるであろう。細胞の収穫前5～10日間の期間の間、ドナーを処置することが好ましい。ドナー内でのCD34⁺幹細胞及び骨髓性系統の他の細胞における増加は、移植受容体における血小板及び／又は赤血球レベルの改善された回復により顕出されるであろう。

本発明の1の態様においては受容体は、血小板回復をさらに強化するために移植後にTPOで処置される。TPOによる移植後処置は、TPO処置ドナーからの骨髓を与えられた、致死照射テスト動物の生存を改善する。“血小板回復を強化するために十分な тромбоポイエチンの量”は、正常な血小板レベルの回復のための時間における統計的に有意な減少又は非処置患者に比較して血小板数における統計的に有意な増加を作り出す量である。移植後処置において使用されるTPOの投与量は、一般に、約3～約20日間にわたり投与される0.51 g／kg／日～401 g／kg／日の範囲内にあるであろう。一般に、骨髓移植を受けた患者は、末梢血液幹細胞移植を受けた患者よりも、より長い移植後処置を必要とするであろう。

本発明における使用のために、TPOは、本分野において一般に知られた方法に従って、遺伝子操作された培養された細胞を使用して調製されることができる。これらの方法を要約するために、TPOをコードするDNA分子が、宿主細胞内でのその維持及び転写を提供する他のDNA配列に連結される。得られた発現ベクターを、宿主細胞

内に挿入し、そして得られた“形質転換された”又は“トランスフェクトされた”細胞を、好適な栄養培地中で培養する。ベビー・ハムスター腎(BHK)細胞が好ましい宿主である。培地中にTPOを分泌するように上記細胞を遺伝子操作することが好ましい。但し、TPOは、細胞溶解産物から回収され、そしてインビトロにおいて処理されて活性タンパク質を得ることができる。一般に、de Sauvage et al., *ibid.*; Lok et al., *ibid.*; Kaushansky et al., *Nature* 369:568-571, 1994; Wending et al., *Nature* 369:571-574, 1994; Bartley et al., *ibid.*; 及び同時係属中の、共有譲渡された米国特許出願逐次番号第08／366,859号及び

逐次番号第08/347,029号（これらを、その全体として引用により本明細書中に取り込む。）を参照のこと。

TP0は、染料ーリガンド・アフィニティー・マトリックス上での直接捕獲及びイオン交換クロマトグラフィーを含む、クロマトグラフィーと他の技術の組合せにより、細胞ならし培養基から精製されることができる。汚染性タンパク質は、ヒドロキシアパタイトへの吸着により除去されることができる。

医薬用途のために、TP0は、慣用の方法に従って非経口的、特に静脈内又は皮下デリバリーのために配合される。静脈内投与は、ボラス注射又は1～数時間の典型的な期間にわたる。輸注によるものであろう。一般に、医薬配合物は、医薬として許容される媒体、例えば、生理食塩水、緩衝液化生理食塩水、水中5%デキストロースその他と共に、造血タンパク質を含むであろう。配合物は、さらに、バイアル表面等上でのタンパク質損失を防ぐために、1以上の賦形剤、保存料、可溶化剤、緩衝剤（例えば、リン酸塩バッファー）、アルブミン又は非イオン洗剤を含むことができる。さらに、TP0は、他のサイトカイン、特に初期に働くサイトカイン、例えば、

幹細胞因子、IL-3, IL-6, IL-11又はGM-CSFと組み合されることができる。このようなコンビネーション療法を利用するとき、サイトカインは、単一配合物において組み合されることができ、又は別個の配合物において投与されることができる。配合の方法は、本分野においてよく知られており、そして例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton PA, 1990(これを引用により本明細書中に取り込む)。中に開示されている。

本発明を以下の非限定的実施例によりさらに説明する。

実施例

実施例 1

マウス・トロンプボイエチンを、トランスフェクトされたベビー・ハムスター腎細胞(BHK 570細胞、ATCC CRL 10314)を使用して調製した。無血清培地は、145 kU/mlの TP0活性を含んでいた。ここで、10ユニットは、標的細胞としてヒト MPLレセプターをコードする発現ベクター(Vigon et al., Proc. Natl. Acad. Sci

. USA 89:5640-5644, 1992)でトランスフェクトされたBaF3細胞を使用した、突然変異誘発(^3H -チミジンの取り込み)における最大刺激の1/2を与えるTP0の量として定義される。BaF3は、ネズミ骨髄由来のインターロイキン-3依存性プレ-リンパ腫細胞系である(Palacios and Steinmetz, *Cell* 41:727-734, 1985; Mathey-Prevot et al., *Mol. Cell. Biol.* 6:4133-4135, 1986)。細胞を、 ^3H -チミジンの存在中、テスト・サンプルに晒した。細胞DNA中に取り込まれた ^3H -チミジンの量を、ヒトTP0の標準曲線との比較により定量した。マウスTP0サンプルは、約100～400U/mlの範囲内でコロニー形成性アッセイにおいて有効であった。インビボ活性は、マ

ウスにおいて20～40kU/日の範囲内で見られた。インビボ実験のために、TP0を、エンドトキシン不含リン酸塩緩衝液化生理食塩水(PBS)中で所望の濃度に希釈し、そして腹膜内又は皮下注射物として投与した。

雌Balb-Cマウス(8～12週齢)は、Broekman B.V. (Somerens, The Netherlands)から得られ、そして商業的に入手可能なげっ歯類食事を与えられ、そして酸性水を任意に与えられた。移植受容体は、病原体を含まない環境で飼養され、そして1mg/mlの濃度におけるシプロフロキサシン(ciprofloxacin)、701g/mgにおけるポリミキシン-B(polymyxine-B)、及び2g/100mlにおけるサッカロースを含む水を与えられた。

受容体マウスを、ポリメチルメタアセテートの箱に入れ、そしてPhilips SL 75-5/6mV線形加速器(Philips Medical Systems, Best, The Netherlands)を使用して照射した。照射を、4Gy/分の投与レートにおいて、後方-前方位と前方-後方位において2部に分割した。このマウスに、定常状態のドナー・マウスからの 10^5 骨髄細胞を移植した。移植を、骨髄収穫から4時間以内に行った。5匹の受容体マウスの群を、移植後、1～5, 3～8又は3～12日目に腹膜内(i.p.)20kU/日の投与量においてTP0で処置した。対照動物に、移植後同様の時間間隔で、等量の骨髄細胞及び所定の生理食塩水を移植した。生理食塩水で処置された対照受容体との比較において、TP0投与は、加速された血小板再構築をもたらさなかった。1～14日目における皮下(s.c.)投与された30kU/日の投与量も

、血小板回復の加速において有効でなかった。白血球又は赤血球の再構築に対する効果は全く見られなかった。

第2セットの実験においては、ドナー・マウスを、マウス当り20kU/日i.p.の投与量において5日間連続してTP0で処置した。5日

目に、マウスを殺し、そして血液、骨髓及び脾臓を収穫した。白血球、赤血球及び血小板を、Sysmex 800カウンター (TOA Medical Electronics Company, Kobe, Japan) 上でカウントした。TP0処置は、血小板の数において2.5倍の増加を引き起こしたが、白血球又は赤血球の数に対する効果は全くもっていなかった。

原細胞レベルも、TP0処置ドナー・マウスにおいて測定した。骨髓細胞を、500 I g/mlペニシリン、250 I g/mlストレプトマイシン、及び2%胎児ウシ血清 (FBS) (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD) を含む RPMI 1640で無菌条件下、大腿骨を洗浄することにより収穫した。脾臓の単一細胞懸濁液を、その臓器をつぶし、そして2% FBSを含む RPMI 1640で1回洗浄することにより調製した。コロニー形成単位 (colony forming units) を測定するために、CFU-GMを、公表された手順に従って培養した (Fibbe et al., J. Immunol. 148:417, 1992)。簡単に言えば、骨髓細胞を、ネズミGM-CSFの存在中 (1.25ng/ml)、半固体培地中に 10^4 細胞/ウェルを含むマイクロタイター・プレート内で培養した。末梢血液単核細胞と脾臓細胞を、それぞれ、 5×10^5 細胞/mlと 10^6 細胞/mlを含む3.5cmの皿内で培養した。細胞を、5% CO₂を含む37℃における十分に加湿した雰囲気中で培養した。6日間の培養の後、(>20細胞の集合体として定義された)コロニーの数を、倒立顕微鏡を用いて格付けした。CFU-混合アッセイを、1.25ng/mlの組換えネズミGM-CSF、2 U/ml組換えヒト EPO、25ng/ml組換えネズミIL-3、5%トランスフェリン、5%ウシ血清アルブミン、5% 10^{-3} b-メルカプトエタノール、と7.5% Iscove's 改変ダルベッコ培地 (IMDM) の組合せの存在中、3.5cm皿内で同一のやり方で行った。十分に加湿された5% CO₂ 雰囲気中37℃での6~7日間の培養の後、コロニー形成細胞の数を、倒立顕微鏡を使用して格付けした。TP0処置は、生理食塩

水処置対照に比較して骨髓又は脾臓におけるコロニー形成単位(CFU)とBFU-Esの増加数をもたらした(表)。

表		
<u>ドナー処置</u>		
	<u>TPO</u>	<u>生理食塩水</u>
大腿骨		
核細胞 ($\times 10^6$)	18.4 \pm 4.7	19.9 \pm 4.3
CFU ($\times 10^3$)	55.3 \pm 12.5*	38.6 \pm 5.2
BFU-E ($\times 10^3$)	24.0 \pm 4.9	16.4 \pm 2.3
脾臓		
核細胞 ($\times 10^6$)	71.8 \pm 35.0	78.4 \pm 42.5
CFU ($\times 10^3$)	27.3 \pm 16.9	16.3 \pm 11.4
BFU-E ($\times 10^3$)	10.2 \pm 2.3	1.9 \pm 0.7

結果を、臓器(大腿骨又は脾臓)当りの絶対細胞数(平均 \pm 標準偏差、n = 7)として表す。
 CFUは、CFU-混合アッセイにおいて培養されたコロニーの全数を表す。* p < 0.05。

致死照射された受容体動物に、5日間連続して20kU/日i.p.の投与量においてTPOで処置されたドナーからの、又は生理食塩水処置された対照ドナーからの⁵骨髓細胞を、移植した。血液サンプルを、尾の静脈採血により3日毎に個々の受容体から移植後に採取した。目に見える出血傾向における差異は、TPO修飾された又は非修飾の骨髓細胞をもつ受容体間で全く観察されなかった。

細胞カウント数を、スチューデントT検定を使用して分析した。MANOVA分析においては、グループを、時間にわたるそれらのコースに対して比較した。分析を、データのlog値に対して行った。<0.05の値を、統計的に有意とみなした。曲線をMANOVAテストを使用して比較した。結果は、TPO処置骨髓の受容体における血小板の再構

成が、生理食塩水処置対照ドナーからの骨髓細胞の同数を移植された対照動物と比較して、有意に変更されていたことを示した(図1)。さらに、血小板最下点

カウント数は、対照骨髄を受容した動物よりも、TP0処置骨髄を受容した動物においてより高かった（移植後12日目において、 88×10^9 対 30×10^9 、20匹のマウスの平均）。図1中に示すように、1～5日目における20kU/日 TP0 i.p.での移植後処置は、TP0ドナー処置からの骨髄を受容したマウスにおける血小板再構築のさらなる加速をもたらさなかった。

血小板の加速された再構成に加えて、TP0-修飾骨髄細胞の受容体は、赤血球の加速された再構築をも示した（図2）。赤血球の最下点カウント数も、非修飾骨髄細胞の同数を移植された対照におけるよりも、上記動物において有意に高かった。実験を、上記効果が赤血球造血（erythropoiesis）に対するTP0の直接的な活性に因り、そして血小板の数と出血傾向における差異に無関係であることをさらに実証するために行った。この実験において、受容体動物を、移植後12日目まで採血しなかった。この時、受容体動物を殺し、そして骨髄と血液から得られた原細胞の数を評価した。TP0修飾骨髄細胞をもつ受容体は、非修飾骨髄細胞の同数を移植された対照よりも、高い数のBFU-Eコロニー/大腿骨（ 770 ± 386 対 422 ± 320 、平均値+標準偏差、 $n = 5$ ）をもち、そしてより高い血液中の網状赤血球（reticulocytes）（44%対8%、5匹のマウスの平均）をもっていた。但し、これらの差異は、統計的に有意ではなかった。TP0での移植後処置は、テストされた投与量において赤血球の再構成のさらなる加速をもたらさなかった。

実施例2

第2の実験を、TP0処置又は非処置ドナーからの骨髄を受容した致死照射されたマウスにおける血小板カウント数を比較し、そして

受容体動物の移植後TP0処置の効果を決定するために、実施した。

B6D2 F1マウスを、Taconic (Germantown, NY)から得て、そして特定の病原体を含まない条件下で飼養した。マウスをカゴ当り5匹で飼養し、そして酸性水と食事を任意に与えた。40匹の雌マウスを受容体として使用し、そして5匹の雄マウスをドナーとして使用した。

組換えヒトTP0を、トランスフェクトされたBHK 570細胞を使用して調製した。主要な分子量種は、70kDバンドであった。この調製物は、5641U/1gの比活

性をもっていた。このタンパク質を、0.05%ポリソルベート80と0.13M NaClを含む29mMリン酸カリウム・バッファー、pH6.0中で調製し、そして20kUアリコートにおいて冷凍保存した。TP0と媒体溶液を、使用直前に解凍し、そして1日に1回、皮下に、マウスに注射した。

2匹のドナー・マウスのそれぞれを、4日間1日当り20kUのTP0で、処置し、そして次に、5日目に断首により殺した。対照ドナーを、媒体だけで処置した。大腿骨を無菌的に取り出し、そして骨髓を、シリンジに接続された25gの針を挿入することにより、2%胎児ウシ血清を含むHam's F12 (Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA)で洗浄した。その細胞懸濁液を、単一細胞懸濁液を作るために18gの針、20gの針及び22gの針を通して2回フラッシュさせた。核のある細胞を、血球計内でカウントした。

— 2日目に、受容体マウスを、 ^{137}Cs 源からの1200cGyの全身照射に晒した (Gammacell 40 Irradiator, Atomic Energy of Canada Radiachemical Company, Kanata, Canada)。骨髓移植を、照射2～3時間後に行った。24匹のマウスが、TP0処置ドナーからの骨髓を受容し (1×10^5 細胞)、そして20匹のマウスが、媒体処置ドナーからの 1×10^5 細胞を受容した。受容体を、TP0 (20kU/日)で

処置し、これは1日目に始まり (移植後2日目)、そして14日間続いた。

マウスを、エーテル麻酔下、後眼窩洞 (retroorbital sinus) から採血した。50の血液サンプルを、ヘパリン化マイクロピペット (VWR Scientific, Seattle, WA)内に集め、そしてEDTA (Becton Dickinson, San Jose, CA)を入れたマイクロタイター管内に滴下した。血液を、ガラス・スライド上にもたらし、そしてスミアを調製した。血液を、Cell Dyn 3500 血液学アナライザー (Abbott, Santa Clara, CA)内で分析した。ヘマトクリット、RBCカウント数、WBCカウント数及び血小板カウント数を測定した。

対照ドナーからの骨髓を受容したマウスにおいては、血小板カウント数は、8日目に低レベル (正常の6%未満)に降下し、そして12日目にTP0処置及び対照動物において回復し始めた (図3)。血小板回復における上記2群間に差異は全くなかった。しかしながら、媒体処置対照においては、10匹の動物の中のたった

3匹が生存し、一方、TPO処置群においては、9匹の動物の中の7匹が生存した。死は、出血に関係した。標準偏差は、TPO処置群内で大きかった。なぜなら、ひじょうに低い血小板カウント数をもついくつかの動物が、生き延びることができたからである。

TPO処置ドナーからの骨髄を受容したマウスは、8日目に正常値の6%未満である血小板数をもっていた。14日間 TPOで処置された動物は、概して、血小板数における、より速い回復をもっていた。7匹の TPO処置動物の中の8匹が生存し、一方、9匹の媒体処置マウスの中のたった4匹が生存した。RBCsは、TPO前処置骨髄を受容し、そして TPOで処置されたマウスにおいて、対照と比較してより速く回復した。白血球回復に対する TPO処置の影響は全くなかった。

以上より、本発明の特定の態様を説明の目的をもって記載してきたけれども、さまざまな変更が本発明の本質及び範囲を逸脱せずに行うことができることが、理解されるであろう。従って、本発明は、添付のクレームによる場合を除き限定されない。

配列表

(2) 配列番号 : 1 についての情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 1062塩基対

(B) タイプ : 核酸

(C) 鎖の数 : 2本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 分子タイプ : cDNA

(ix) 特徴 :

(A) 名称/キー : CDS

(B) 位置 : 1..1059

(xi) 配列番号 : 1 :

ATG GAG CTG ACT GAA TTG CTC CTC GTG GTC ATG CTT CTC CTA ACT GCA	48
Met Glu Leu Thr Glu Leu Leu Leu Val Val Met Leu Leu Leu Thr Ala	
1 5 10 15	
AGG CTA ACG CTG TCC AGC CCG GCT CCT CCT GCT TGT GAC CTC CGA GTC	96
Arg Leu Thr Leu Ser Ser Pro Ala Pro Pro Ala Cys Asp Leu Arg Val	
20 25 30	
CTC AGT AAA CTG CTT CGT GAC TCC CAT GTC CTT CAC AGC AGA CTG AGC	144
Leu Ser Lys Leu Leu Arg Asp Ser His Val Leu His Ser Arg Leu Ser	
35 40 45	
CAG TGC CCA GAG GTT CAC CCT TTG CCT ACA CCT GTC CTG CTG CCT GCT	192
Gln Cys Pro Glu Val His Pro Leu Pro Thr Pro Val Leu Leu Pro Ala	
50 55 60	
GTG GAC TTT AGC TTG GGA GAA TGG AAA ACC CAG ATG GAG GAG ACC AAG	240
Val Asp Phe Ser Leu Gly Glu Trp Lys Thr Gln Met Glu Glu Thr Lys	
65 70 75 80	
GCA CAG GAC ATT CTG GGA GCA GTG ACC CTT CTG CTG GAG GGA GTG ATG	288
Ala Gln Asp Ile Leu Gly Ala Val Thr Leu Leu Leu Glu Gly Val Met	
85 90 95	

GCA GCA CGG GGA CAA CTG GGA CCC ACT TGC CTC TCA TCC CTC CTG GGG	336
Ala Ala Arg Gly Gln Leu Gly Pro Thr Cys Leu Ser Ser Leu Leu Gly	
100 105 110	
CAG CTT TCT GGA CAG GTC CGT CTC CTC CTT GGG GCC CTG CAG AGC CTC	384
Gln Leu Ser Gly Gln Val Arg Leu Leu Leu Gly Ala Leu Gln Ser Leu	
115 120 125	
CTT GGA ACC CAG CTT CCT CCA CAG GGC AGG ACC ACA GCT CAC AAG GAT	432
Leu Gly Thr Gln Leu Pro Pro Gln Gly Arg Thr Thr Ala His Lys Asp	
130 135 140	
CCC AAT GCC ATC TTC CTG AGC TTC CAA CAC CTG CTC CGA GGA AAG GTG	480
Pro Asn Ala Ile Phe Leu Ser Phe Gln His Leu Leu Arg Gly Lys Val	
145 150 155 160	
CGT TTC CTG ATG CTT GTA GGA GGG TCC ACC CTC TGC GTC AGG CGG GCC	528
Arg Phe Leu Met Leu Val Gly Gly Ser Thr Leu Cys Val Arg Arg Ala	
165 170 175	
CCA CCC ACC ACA GCT GTC CCC AGC AGA ACC TCT CTA GTC CTC ACA CTG	576
Pro Pro Thr Thr Ala Val Pro Ser Arg Thr Ser Leu Val Leu Thr Leu	
180 185 190	
AAC GAG CTC CCA AAC AGG ACT TCT GGA TTG TTG GAG ACA AAC TTC ACT	624
Asn Glu Leu Pro Asn Arg Thr Ser Gly Leu Leu Glu Thr Asn Phe Thr	
195 200 205	
GCC TCA GCC AGA ACT ACT GGC TCT GGG CTT CTG AAG TGG CAG CAG GGA	672
Ala Ser Ala Arg Thr Thr Gly Ser Gly Leu Leu Lys Trp Gln Gln Gly	
210 215 220	
TTC AGA GCC AAG ATT CCT GGT CTG CTG AAC CAA ACC TCC AGG TCC CTG	720
Phe Arg Ala Lys Ile Pro Gly Leu Leu Asn Gln Thr Ser Arg Ser Leu	
225 230 235 240	
GAC CAA ATC CCC GGA TAC CTG AAC AGG ATA CAC GAA CTC TTG AAT GGA	768
Asp Gln Ile Pro Gly Tyr Leu Asn Arg Ile His Glu Leu Leu Asn Gly	
245 250 255	
ACT CGT GGA CTC TTT CCT GGA CCC TCA CGC AGG ACC CTA GGA GCC CCG	816
Thr Arg Gly Leu Phe Pro Gly Pro Ser Arg Arg Thr Leu Gly Ala Pro	
260 265 270	
GAC ATT TCC TCA GGA ACA TCA GAC ACA GGC TCC CTG CCA CCC AAC CTC	864
Asp Ile Ser Ser Gly Thr Ser Asp Thr Gly Ser Leu Pro Pro Asn Leu	
275 280 285	

CAG CCT GGA TAT TCT CCT TCC CCA ACC CAT CCT CCT ACT GGA CAG TAT Gln Pro Gly Tyr Ser Pro Ser Pro Thr His Pro Pro Thr Gly Gln Tyr 290 295 300	912
ACG CTC TTC CCT CTT CCA CCC ACC TTG CCC ACC CCT GTG GTC CAG CTC Thr Leu Phe Pro Leu Pro Pro Thr Leu Pro Thr Pro Val Val Gln Leu 305 310 315 320	960
CAC CCC CTG CTT CCT GAC CCT TCT GCT CCA ACG CCC ACC CCT ACC AGC His Pro Leu Leu Pro Asp Pro Ser Ala Pro Thr Pro Thr Pro Thr Ser 325 330 335	1008
CCT CTT CTA AAC ACA TCC TAC ACC CAC TCC CAG AAT CTG TCT CAG GAA Pro Leu Leu Asn Thr Ser Tyr Thr His Ser Gln Asn Leu Ser Gln Glu 340 345 350	1056
GGG TAA Gly	1062

(2) 配列番号 : 2 についての情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 353アミノ酸

(B) タイプ : アミノ酸

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 分子タイプ : タンパク質

(xi) 配列番号 : 2 :

Met Glu Leu Thr Glu Leu Leu Leu Val Val Met Leu Leu Leu Thr Ala 1 5 10 15
Arg Leu Thr Leu Ser Ser Pro Ala Pro Pro Ala Cys Asp Leu Arg Val 20 25 30
Leu Ser Lys Leu Leu Arg Asp Ser His Val Leu His Ser Arg Leu Ser 35 40 45
Gln Cys Pro Glu Val His Pro Leu Pro Thr Pro Val Leu Leu Pro Ala 50 55 60
Val Asp Phe Ser Leu Gly Glu Trp Lys Thr Gln Met Glu Glu Thr Lys 65 70 75 80

Ala Gln Asp Ile Leu Gly Ala Val Thr Leu Leu Leu Glu Gly Val Met
 85 90 95

Ala Ala Arg Gly Gln Leu Gly Pro Thr Cys Leu Ser Ser Leu Leu Gly
 100 105 110

Gln Leu Ser Gly Gln Val Arg Leu Leu Leu Gly Ala Leu Gln Ser Leu
 115 120 125

Leu Gly Thr Gln Leu Pro Pro Gln Gly Arg Thr Thr Ala His Lys Asp
 130 135 140

Pro Asn Ala Ile Phe Leu Ser Phe Gln His Leu Leu Arg Gly Lys Val
 145 150 155 160

Arg Phe Leu Met Leu Val Gly Gly Ser Thr Leu Cys Val Arg Arg Ala
 165 170 175

Pro Pro Thr Thr Ala Val Pro Ser Arg Thr Ser Leu Val Leu Thr Leu
 180 185 190

Asn Glu Leu Pro Asn Arg Thr Ser Gly Leu Leu Glu Thr Asn Phe Thr
 195 200 205

Ala Ser Ala Arg Thr Thr Gly Ser Gly Leu Leu Lys Trp Gln Gln Gly
 210 215 220

Phe Arg Ala Lys Ile Pro Gly Leu Leu Asn Gln Thr Ser Arg Ser Leu
 225 230 235 240

Asp Gln Ile Pro Gly Tyr Leu Asn Arg Ile His Glu Leu Leu Asn Gly
 245 250 255

Thr Arg Gly Leu Phe Pro Gly Pro Ser Arg Arg Thr Leu Gly Ala Pro
 260 265 270

Asp Ile Ser Ser Gly Thr Ser Asp Thr Gly Ser Leu Pro Pro Asn Leu
 275 280 285

Gln Pro Gly Tyr Ser Pro Ser Pro Thr His Pro Pro Thr Gly Gln Tyr
 290 295 300

Thr Leu Phe Pro Leu Pro Pro Thr Leu Pro Thr Pro Val Val Gln Leu
 305 310 315 320

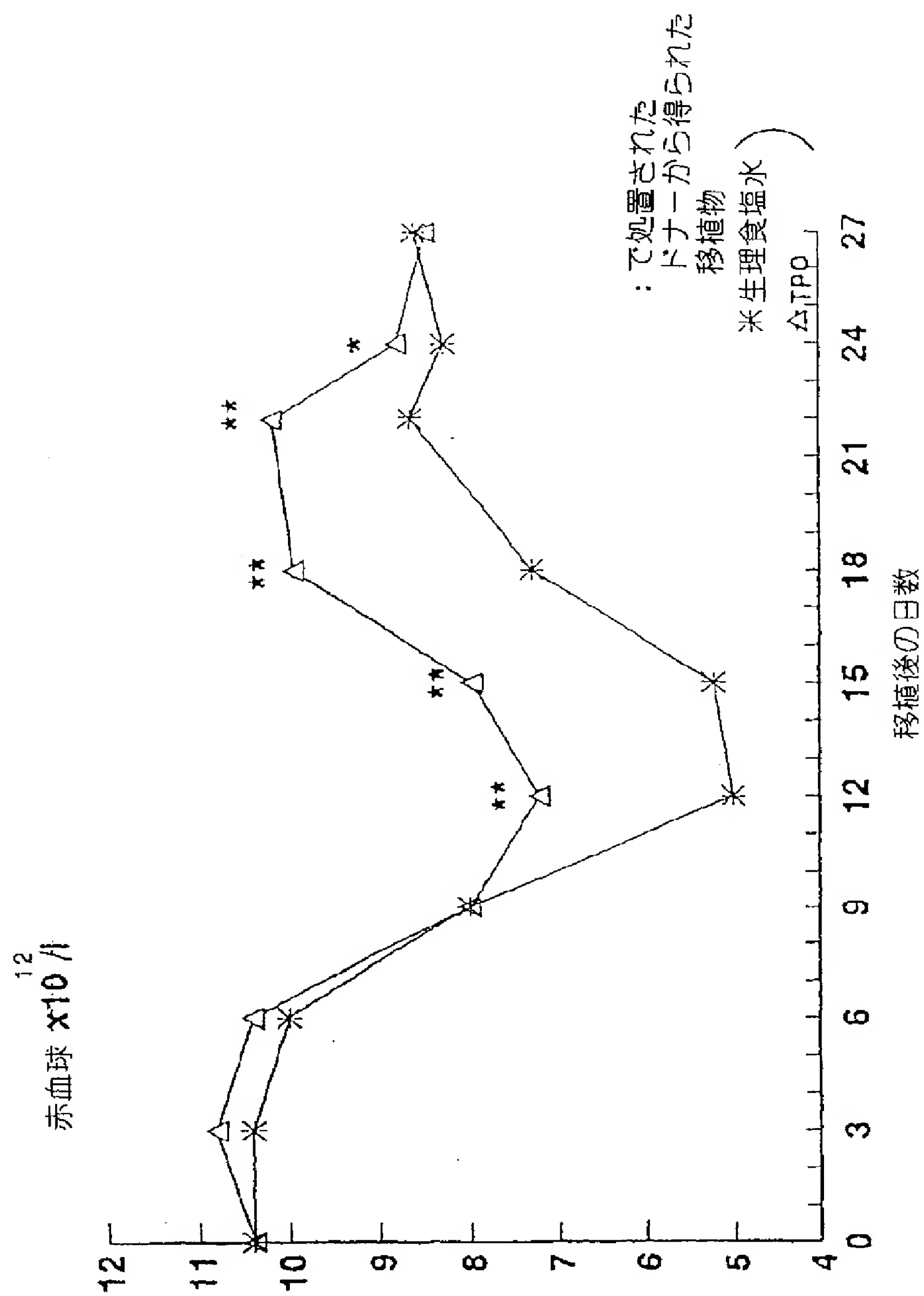
His Pro Leu Leu Pro Asp Pro Ser Ala Pro Thr Pro Thr Pro Thr Ser
325 330 335

Pro Leu Leu Asn Thr Ser Tyr Thr His Ser Gln Asn Leu Ser Gln Glu
340 345 350

Gly

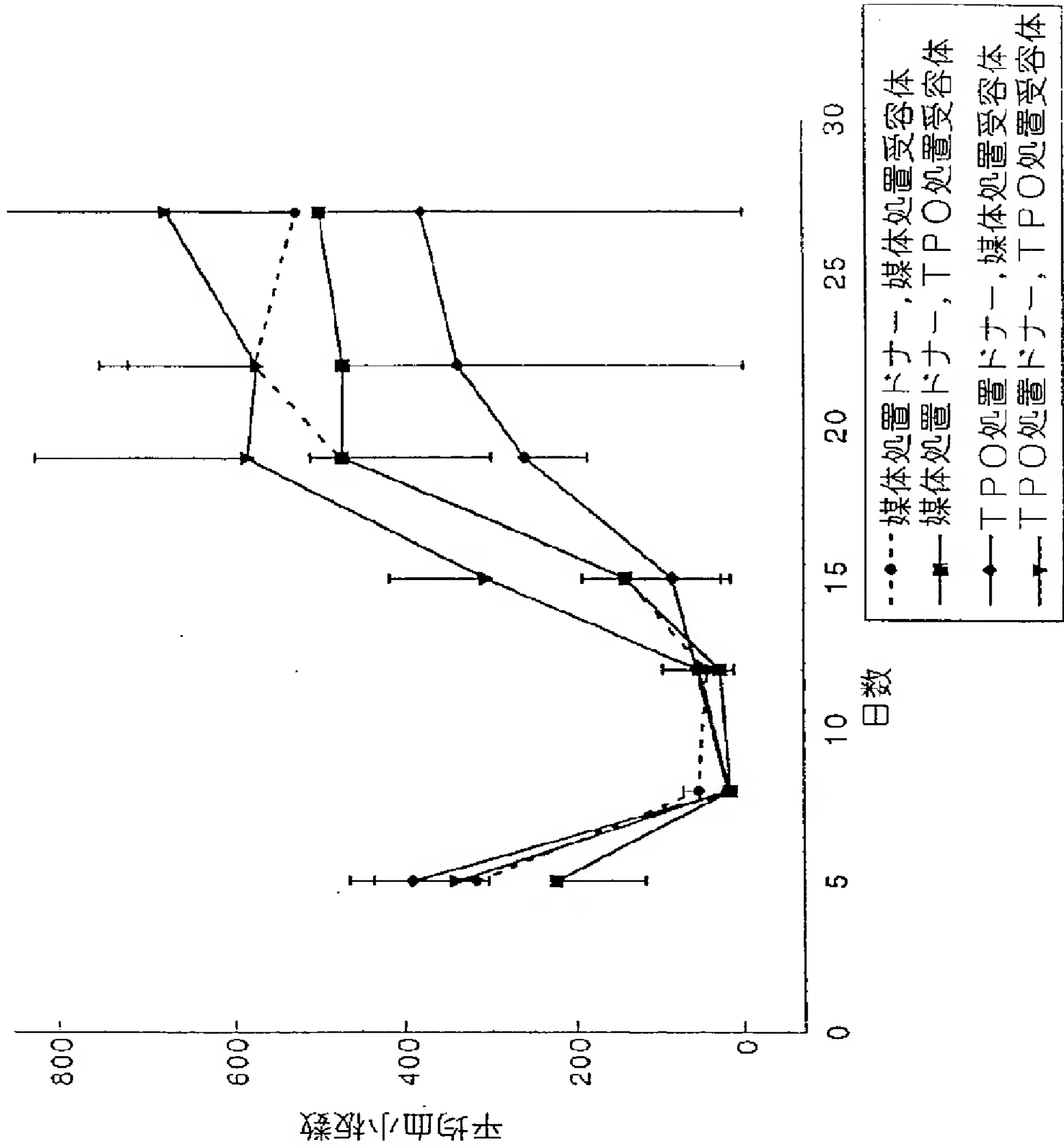
【図2】

FIG. 2



【 図 3 】

FIG. 3



【手続補正書】

【提出日】1998年2月27日

【補正内容】

請求の範囲

1. 造血細胞の増加を必要とする受容体患者において造血細胞を増加させるための、骨髓細胞又は末梢血液幹細胞を含む医薬組成物であって、上記細胞が、上記骨髓系統の細胞の増殖を刺激するためにトロンボポイエチン(TPO)が投与されたドナーから、採集されていることを特徴とする医薬組成物。

2. 化学療法又は放射線療法を受けた患者において血小板又は赤血球回復を刺激するための、骨髓細胞又は末梢血液幹細胞を含む医薬組成物であって、上記細胞が、上記骨髓系統の細胞の増殖を刺激するためにTPO が投与されたドナーから採取されていることを特徴とする医薬組成物。

3. 前記ドナーと前記受容体患者が同一の個体であり、場合により、その受容体患者が、前記採取段階と前記第2投与段階との間に化学療法又は放射線により処置される、請求項1又は2に記載の医薬組成物。

4. 血小板回復又は赤血球回復を強化するために十分なTPO の投与と同時に又はその投与前に、前記細胞が投与される、請求項1～3のいずれか1項に記載の医薬組成物。

5. ドナーから受容体患者へ移植するための細胞の調製方法であって：

そのドナーに、そのドナーにおける骨髓系統の細胞の増殖を刺激するために十分な量のTPO を投与し；そして

そのドナーから、骨髓細胞又は末梢血液幹細胞である細胞を採取する、ことを含み、ここで、上記ドナーと上記受容体患者が同一の個体ではないことを特徴とする方法。

6. 骨髓細胞又は末梢血液幹細胞のドナーにおいて、骨髓系統の細胞の増殖を刺激するための、TPO を含む医薬組成物。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/US 96/07880		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 A61K38/19 A61K35/28		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 A61K C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NATURE, vol. 369, 1994, LONDON GB, pages 519-520, XP002013270 DONALD METCALF: "Thrombopoietin-at last" see page 520, columns 2-3 ---	1-17
A	LANCET THE, vol. 339, 1992, LONDON GB, pages 640-644, XP002013271 SHERIDAN, W.P. ET AL: "Effect of peripheral-blood progenitor cells mobilised by filgrastim (G-CSF) on platelet recovery after high-dose chemotherapy" see the whole document --- -/-	1-17
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 13 September 1996		Date of mailing of the international search report 24.09.1996
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5118 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer Fernandez y Branas, F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter nal Application No
PC1/US 96/07880

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	BLOOD, vol. 86, no. 9, 1 November 1995, pages 3308-3313, XP000602034 FIBBE W.E. ET AL: "Accelerated reconstitution of platelets and erythrocytes after syngenic transplantation of bone marrow cells derived from thrombopoietin pretreated donor mice" see the whole document ---	1-17
A	BLOOD, vol. 84, no. 10, 1994, page 242a XP002013272 SPRUGEL K.H. ET AL: "Recombinant thrombopoietin stimulates rapid platelet recovery in thrombocytopenic mice" see abstract 952 ---	1-17
A	NATURE, vol. 369, 1994, LONDON GB, pages 533-538, XP002013273 FREDERIC J. DE SAUVAGE: "Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by the c-MPL ligand" see the whole document ---	1-17
A	STEM CELLS, vol. 12, no. 1, 1994, pages 91-97, XP002013274 KAUSHANSKY K. : "The mpl ligand: Molecular and cellular biology of the critical regulator of megakaryocyte development" see the whole document ---	1-17
A	NATURE, vol. 369, 1994, LONDON GB, pages 568-571, XP002013275 KAUSHANSKY K. ET AL: "Promotion of megakaryocyte progenitor expansion and differentiation by the c-MPL ligand thrombopoietin" see the whole document -----	1-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 96/07880

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 1-8, 13-17
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Remark: Although these claims are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(KE, LS, MW, SD, SZ, UG), UA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, UZ, VN